

ISOLASI DAN KARAKTERISASI MIKROBA TERMOFILIK PENGHASIL XILANASE DARI LUMPUR PANAS LAPINDO SEBAGAI ALTERNATIF PENGGANTI KLOLIN PADA INDUSTRI KERTAS

Fadeli Muhammad Habibie¹, Divan Probo Sigres¹, Luqvia Noer Islami S¹.

¹Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya
Email : fayt.fadel@gmail.com

ABSTRACT

This study aimed to isolate xylanase producing microbe from hot mud in Lapindo area disaster. This microbes were supposed to be extremophilic bacterium because of extreme condition of hot mud. This study comprised of sampling hot mud disaster, isolation and characterization of thermophilic isolates, and characterization of thermophilic xylanase. The result showed that 14 xylanolytic isolates were obtained and one isolate (C211) had the best xylanase activity. This enzyme had optimum activity at 50 °C and pH 7.0, and showed the hydrolytic activity of 2.60 unit/mL/min.

Keyword: xylanase, thermophilic microbe, hot mud disaster, Lapindo

1. PENDAHULUAN

Lumpur Lapindo merupakan bencana nasional sejak 29 Mei 2006 akibat aktivitas pengeboran minyak yang dilakukan oleh PT. Lapindo Brantas (Davies, 2007). Hingga saat ini belum ada tanda-tanda bahwa semburan lumpur tersebut akan berhenti dan telah menyemburkan hampir 6,4 juta meter kubik (AFP, 2013). Lumpur panas Lapindo ini telah menenggelamkan perumahan penduduk, sekolah, pabrik dan areal persawahan di sekitarnya. Lumpur panas yang dihasilkan mengandung karbon organik sebesar 54,7-55,47%, Pb sebesar 0,27-0,34 mg/L, dan Cu sebesar 0,83-1,31 mg/L dan memiliki suhu antara 45-70°C dengan kondisi alkali. Karakteristik ini menjadikan lumpur lapindo sebagai sumber mikroorganisme yang bersifat termofilik atau hipertermofilik. Selain itu dikarenakan lokasi kejadian lumpur panas berada di sekitar areal pertanian, dimungkinkan terdapat mikroorganisme termofilik yang mampu mendegradasi komponen penyusun tanaman dan dapat tumbuh pada kondisi alkali. Salah satu komponennya adalah xilan. Xilan merupakan polimer dari xilosa yang banyak ditemukan di dalam hemiselulosa. Hemiselulosa, lignin, dan selulosa merupakan komponen yang membentuk struktur kayu. Oleh karena itu, dimungkinkan terdapat beberapa mikroorganisme yang mampu menghasilkan enzim xilanase yang tumbuh di lumpur panas Lapindo. Enzim yang dihasilkan

oleh mikroorganisme termofilik dapat aktif pada temperatur tinggi, sehingga berpotensi untuk dimanfaatkan pada industri yang menggunakan proses pada temperatur yang tinggi (Agustini, 2010).

Xilanase merupakan salah satu jenis enzim yang banyak dimanfaatkan pada industri. Umumnya enzim ini digunakan sebagai biokonversi lignoselulosa menjadi gula, etanol, penjernih jus, pakan ternak dan pemutihan kertas (Viikari *et al.*, 2001). Enzim xilanase banyak digunakan dalam industri kertas. Salah satu kelebihanannya adalah kertas yang dihasilkan lebih ramah lingkungan (Christove *et al.*, 1999). Menurut Thakur *et al.*, (2012) enzim xilanase dapat dihasilkan dari beberapa mikroorganisme seperti bakteri, kapang, dan khamir (Shao dan Wigel, 1992).

Pada industri kertas, kegiatan utamanya adalah proses *pulping* dan *bleaching* menggunakan klorin sebagai agen pemutih. Meskipun kertas yang dihasilkan sangat bagus, akan tetapi menimbulkan polusi terhadap lingkungan. Oleh karena itu limbah dari pabrik kertas harus diolah kembali dulu sebelum dibuang ke dalam air. Belakangan ini, enzim memegang peranan penting pada beberapa industri untuk menghasilkan produk ramah lingkungan. Enzim xilanase juga dapat digunakan sebagai agen *biobleaching*. Enzim ini mampu menghidrolisis hemiselulosa yang mengikat lignin dan kromosfor kayu. Menurut Shallom dan Shoham (2003), xilan merupakan

komponen utama hemiselulosa pada kayu dan ranting. Xilan yang terdegradasi dari struktur hemiselulosa akan melepaskan kromosfor kayu yang mudah teroksidasi. Xilan yang terhidrolisis akan dengan mudah terjadinya reaksi oksidatif pada proses *bleaching* (Das *et al.*, 2013). Penggunaan xylanase pada proses pemutihan kertas akan mampu menurunkan penggunaan klorin dan menghasilkan kertas yang lebih ramah lingkungan (Thakur, 2012). Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan enzim xilanase yang dihasilkan mikroorganisme termofilik dari lumpur panas Panas. Enzim xilanase dikarakterisasi agar dapat diterima pada proses pemutihan kertas.

2. METODE

Preparasi Media Xilan Kasar dari Tongkol Jagung. Tongkol jagung didapatkan dari Pasar belimbing Malang Jawa Timur dan digiling sampai lolos saringan 40 mesh. Xilan kasar yang dihasilkan selanjutnya digunakan sebagai media pengkayaan untuk menginduksi pertumbuhan mikroorganisme dalam sampel.

Proses Pengambilan Sampel. Sampel diambil dari lumpur panas Lapindo Porong, Sidoarjo Jawa Timur pada 3 titik yang berbeda. Setiap lokasi pengambilan sampel diukur suhu dan pH menggunakan termometer dan kertas lakmus dan pH meter. Sampel selanjutnya dibawa menuju ke laboratorium untuk dilakukan isolasi dan seleksi.

Pengkayaan dan Isolasi Mikroorganisme Termofilik Xilanolitik. Sampel dilakukan pengkayaan menggunakan media Luria Bertani (LB) yang ditambahkan xilan kasar 1%. Sampel diinokulasikan kedalam media dengan perbandingan 1 : 2 dalam tabung erlenmeyer 250 dan diinkubasi pada suhu 55°C, 120 rpm selama 72 jam. Setelah dilakukan pengkayaan dilakukan pengenceran hingga 10⁻⁵ dan diambil 3 pengenceran terakhir. Selanjutnya dilakukan isolasi menggunakan metode *pour plate* dan *spread plate* pada media Nakamura yang mengandung 2 g LB, 0,1 g KH₂PO₄, 0,02 g MgSO₄·7H₂O dan ditambahkan xilan kasar 0.5 g per 100 ml (Nakamura *et al.*, 1993, 1995). Isolat diinkubasikan pada suhu 55°C selama 48 jam untuk menseleksi mikroorganisme termofilik.. Setiap isolat yang tumbuh dilakukan isolasi kembali untuk pemurnian dan identifikasi. Pemurnian isolat dilakukan hingga

mendapatkan koloni yang terpisah pada media Nakamura.

Identifikasi Mikroorganisme Termofilik Xilanolitik. Identifikasi awal dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada media Nakamura yang mengandung *beechwood xylan* 0.5 % dan mengamati zona bening yang terbentuk. Isolat terpilih yang mampu menghasilkan zona bening dilakukan tahap identifikasi secara morfologi, mikroskopis, dan biokimia. Pengamatan morfologi meliputi bentuk, tepian dan warna pada koloni. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram dan pewarnaan Endospora untuk mengetahui jenis Gram dan keberadaan endospora pada isolat. Uji biokimia sederhana meliputi uji katalase, uji sitrat, uji MR (*Methyl Red*), uji VP (*Voges-Proskauer*), dan uji indole.

Produksi Enzim Xilanase Termofilik. Isolat terpilih diinokulasikan pada media Luria Bertani untuk mengetahui waktu pertumbuhan optimal. Sebanyak 10 ml kultur cair dimasukkan ke dalam 140 ml media Nakamura dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 18 jam. Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan mensentrifugasi kultur inokulum pada kecepatan 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.

Pengujian Aktivitas Xilanase. Pengujian aktivitas enzim xilanase dilakukan dengan mengukur kadar gula reduksi dari *beechwood xylan* menggunakan metode *Dinitrosalicylic acid* (DNS) (Miller, 1959). Sebanyak 1 ml substrat ditambahkan supernatan 1 ml dan diinkubasikan pada suhu 55°C. Setelah 1 jam, ditambahkan 3 ml larutan DNS dan didiamkan 10 menit. Kemudian dididihkan selama 5 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. 1 unit aktivitas enzim xilanase didefinisikan sebagai jumlah enzim xilanase yang dibutuhkan untuk melepaskan 1 µmol gula reduksi per menit pada kondisi reaksi optimum.

Penentuan pH dan Suhu Optimum Enzim Xilanase. Penentuan pH optimum enzim xilanase dilakukan dengan menginkubasi 1 ml enzim dan 1 ml substrat xilan (*beechwood xylan* 1%) pada rentang pH 5,0-8,0. Buffer yang digunakan adalah buffer asetat, pH 4 dan 5, bufer fosfat, pH 6 dan 7, bufer Tris-HCl pH 8-9. Untuk menentukan pH optimal enzim diinkubasi selama 1 jam pada suhu 55°C dan diukur aktivitasnya sesuai dengan pengujian aktivitas enzim. Penentuan

suhu optimum enzim xilanase dilakukan dengan menggunakan prosedur yang sama dengan diatas selama 1 jam dengan variasi suhu 45⁰C, 50⁰C, dan 55⁰C.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel Lumpur. Hasil Pengukuran suhu dan pH di lumpur panas Lapindo menunjukkan bahwa lumpur yang diambil memiliki suhu diatas 45⁰C dan pH alkali. Nilai suhu dan pH lumpur Lapindo dapat dilihat di Tabel 1. Lumpur panas Lapindo memiliki suhu yang tinggi dan pH alkali sehingga ditemukan adanya mikroorganisme termofilik alkalofilik.

Tabel 1. Nilai Suhu dan pH Sampel Lumpur Panas Lapindo Porong, Sidoarjo Jawa Timur

Sample	Suhu (°C)	pH
Sampel 1	45	7,6
sampel 2	48	8,0
Sampel 3	53	8,1

Isolasi dan Identifikasi Mikroorganisme termofilik Xilanolitik. Isolat termofilik mampu tumbuh pada temperatur 45-70⁰C. Pada penelitian ini digunakan *beechwood xylan* 0.5% dalam medium untuk menseleksi mikro organisme yang mampu menghasilkan enzim xilanase. Adanya zona bening di sekitar menunjukkan bahwa isolat yang tumbuh dapat mendegradasi xilan dikarenakan adanya aktivitas hidrolisis. Didapatkan tital 14 isolat dari lumpur panas Lapindo yang tumbuh pada suhu 55⁰C di media Nakamura. Penelitian dari Ghatora *et al.* (2006) menunjukkan bahwa mikroorganisme termofilik dan termotoleran mampu menghasilkan enzim xilanase. Aktivitas xilanoliti pada semua isolat dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Aktivitas Xilanolitik Mikroorganisme Termofilik Berdasarkan Rasio antara Diameter Zona Bening dengan Diameter Koloni.

Isolat	Diameter Koloni (cm)	Diameter Zona Bening (cm)	Aktivitas Hidrolisis
A102	0,70	1,10	1,57
A103	0,70	1,10	1,57
B101	0,70	1,00	1,43
B102	0,90	1,30	1,44
C101	0,80	1,20	1,50
C102	0,80	1,20	1,50
C103	0,90	1,20	1,33
C111	1,00	1,30	1,30
C112	0,70	1,10	1,57
C113	0,80	1,20	1,50
C114	0,90	1,30	1,44
C115	0,70	1,10	1,57
C211	0,60	1,00	1,67
C212	0,70	1,10	1,57

Seluruh isolat yang didapat diidentifikasi dan karakterisasi berdasarkan morfologi, mikroskopis, dan uji biokimiawi. Dari hasil pengujian diduga isolat yang didapatkan merupakan genus *Bacillus sp.* Genus *Bacillus sp.* memiliki karakteristik sel yang berbentuk batang lurus, berukuran antara 0,5-2,5 x 1,2-10 µm dan sering bergerombol. Penelitian yang dilakukan Das *et al.* (2013) menunjukkan bahwa karakterisasi morfologi dan biokimiawi terhadap isolat bakteri merupakan golongan strain1 sampai strain 5 yang teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus*, *B. pumilus*, *Alkaligens sp.* *Arthrobacter sp.* Dan *Enterobacter sp.* Diantara 5 strain tersebut, *Arthrobacter sp* menunjukkan hasil yang terbaik sebagai penghasil xilanase. Penelitian oleh Hiremart dan patil (2011) menunjukakn *Bacillus* alkalotermotabil yang berhasil diisolasi dari berbagai tempat di Bidar, india menggunakan media xilan mampu menghasilkan enzim xilanase.

Tabel 3. Morfologi Koloni Mikroorganisme Termofilik Penghasil Xilanase

Isolat	Morfologi		Gram	Endospora
	Bentuk	Warna		
A102	Kokus	Putih	Positif	Ada
A103	Kokus	Putih	Positif	Ada
B101	Basil	Putih	Positif	Ada
B102	Basil	Putih	Positif	Ada
C101	Basil	Putih	Positif	Ada
C102	Basil	Putih	Positif	Ada
C103	Basil	Putih	Positif	Ada
C111	Kokus	Putih	Positif	Ada
C112	Basil	Putih	Positif	Ada
C113	Basil	Putih	Positif	Ada
C114	Basil	Putih	Positif	Ada
C115	Basil	Putih	Positif	Ada
C211	Basil	Putih	Positif	Ada
C212	Basil	Putih	Positif	Ada

Tabel 4. Hasil Uji Biokimia Mikroorganisme termofilik Penghasil Xilanase

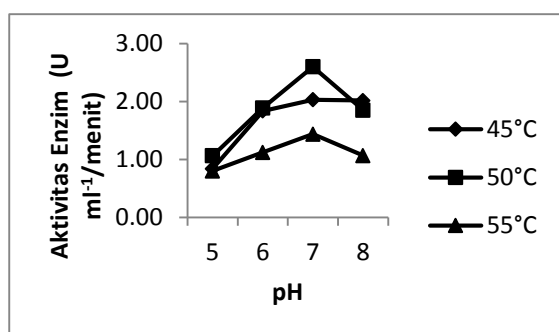
Isolat	Katalase	Methyl Red	Voges Proskeauer	Motilitas	Indol	Ornithine	Sitrat
A102	-	-	+	+	+	-	-
A103	-	-	-	-	+	+	-
B101	-	-	-	-	+	-	-
B102	-	+	-	+	+	-	-
C101	-	+	+	-	+	-	-
C102	-	+	-	-	+	-	-
C103	-	-	+	-	+	-	-
C111	-	-	+	+	+	-	-
C112	-	-	+	+	+	-	-
C113	+	+	+	+	-	+	-
C114	+	-	+	-	-	+	-
C115	+	-	+	+	+	-	-
C211	-	-	+	+	+	+	-
C212	-	+	+	+	-	+	-

Keterangan: (+) Hasil uji positif, (-) Hasil uji negatif

Berdasarkan karakteristik biokimiawi, seluruh isolat merupakan tipe Gram positif yang mampu menghasilkan endospora. Hampir seluruh isolat menghasilkan motil dan aerob atau anerob fakultatif. Hasil dari pengamatan secara morfologi dapat dilihat pada tabel 3 dan karakteristik biokimiawi pada tabel 4. Dari isolat yang berhasil diisolasi, isolat C211 memiliki zona bening terbesar. Isolat tersebut selanjutnya digunakan untuk produksi dan karakterisasi enzim xilanase.

Aktivitas Enzim Xilanase. Temperatur dan pH sangat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme dan aktivitas enzim (Knob dan Carmona, 2008). Temperatur yang tinggi baik digunakan untuk menyeleksi mikroorganisme termofilik dan hipertermofilik. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa isolat C211 mampu tumbuh pada suhu 55°C sehingga dapat disimpulkan merupakan mikroorganisme termofilik dan diharapkan mampu menghasilkan enzim xilanase yang tahan dan stabil pada suhu tinggi. Umumnya enzim yang termostabil bisa didapatkan dari mikroorganisme yang dapat tumbuh di atas suhu 45°C.

Dari hasil pengujian didapatkan bahwa enzim xilanase yang dihasilkan oleh isolat C211 memiliki aktivitas optimum pada pH 7.0 dan pada suhu 50°C. Aktivitas enzim xilanase 2.60 unit/mL/min. Sedangkan pada suhu 50°C hanya 1.438 unit/mL/min. Pengaruh pH dan suhu enzim xilanase ditunjukkan pada gambar 2. Penelitian oleh Das *et al.* (2013) menunjukkan bahwa 4 isolat yang didapatkan dari limbah kertas menunjukkan aktivitas enzim sebesar 82.30 IU/mL dan 100 IU/mL pada pH 7.0 dan 9.2



Gambar 1. Pengaruh Suhu dan pH terhadap aktivitas Enzim Xilanase Isolat C211 dari Lumpur Panas Lapindo.

4. KESIMPULAN

Sebanyak 14 isolat xilanolitik telah berhasil didapatkan dan isolat C211 memiliki aktivitas enzim terbesar. Enzim xilanase yang dihasilkan memiliki aktivitas optimum pada suhu 50°C dan pH 7.0 dengan total aktivitas sebesar 2,60 unit/mL/min.

5. REFERENSI

- AFP, 2013. New study ignites debate over Indonesia's mud volcano. Phys.org. 22 Jul 2013. Downloaded at <http://phys.org/news/2013-07-ignites-debate-indonesia-mud-volcano.html>
- Agustini, R. 2010. Protease Characterization and Amobilization from Thermophilic Isolate Cg-10 Isolated from Hot Water Spring Cangar-East Java. Research Report, Airlangga University, Surabaya, Indonesia.
- Christov LP, Szakacs G, Balakrishnan H (1999). Production partial characterization and use of fungal cellulase free xylanase in pulp bleaching. Pro. Biochem. 34: 511-517.
- Das, M., Singh, S. and B. Tanti. 2013 Studies on Soil Biomass and Xylanases Producing Bacteria in Paper Mill Effluent Affected Soil. International Journal of Scientific Research 2(4): 77-78.
- Davies, R, Swarbrick, RE, Evans, RJ & Huuse, M (2007) Birth of a mud volcano: East Java. GSA Today, 29 May, p.4-9.
- Ghatora, S.K., B.S. Chada, A.K. Bhadan, H.S. Saini, and M.K. Bat. 2006. Identification and isolation of diverse xylanases from thermophilic and thermotolerant fungi. BioResources 1(1): 18-33.
- Hiremath, K.S. and Patil C.S. 2011. Isolation, production and characterization of alkalophilic thermostable xylanase from newly isolated *Bacillus* sp. International Journal of Biotechnology Applications 3(1): 48-51.
- Juniawan, A., B. Rumhayati, and B. Ismuyanto. 2012. The Effect of Carbon Organic Total and Salinity on The Discharge of Heavy Metals Pb and Cu in Lapindo Mud into the Aloo River. J. Pure App. Chem. Res. 1(1), 41-50.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing

- sugar. Analytical Chemistry 31(3): 426-428.
- Nakamura S, Nakai R, Wakabayashi K, Ishiguro Y, Aono R, Horikoshi K. 1994. *Thermophilic alkaline xylanase from newly isolated alkaliphilic and thermophilic Bacillus* sp. strain TAR-1. Biosci Biotechnol Biochem 58:78-81.
- Nakamura S, Ishiguro Y, Nakai R, Wakabayashi K, Aono R, Horikoshi K. 1995. *Purification of a thermophilic alkaline xylanase from thermophilic Bacillus* sp strain TAR-1. J Mol Catal B: Enzymatic 1:7-15.
- Shallom, D and Y. Shoham. 2003. Microbial hemicellulases. Curr Opin Microbial 6: 219-228.
- Shao W, Wiegel J. 1992. Purification and characterization of athermostable -xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. J. Bacteriol, 174: 5848-5853.
- Thakur, V.V. , R.K. Jain, and R.M.Mathur. 2012. Studies on xylanase and laccase enzymatic prebleaching to reduce chlorine based chemicals during CEF and ECF bleaching. BioResources 7(2) 2220-2235.
- Viikari L, Kantelinen A, Sundqvist J, Linko M (2001). Xylanases in bleaching from an idea to the industry. FEMS Microbiol. Rev. 13: 335-350.